

诺卡酮对抑郁样行为和 海马中 PKA/CREB/BDNF 信号通路的影响

王凯新^{1,2}, 王三旺³, 翟庆龄², 赵 娣¹, 刘 晶¹, 孟凡涛¹, 李 晨¹, 陈金波²

摘要 目的 观察诺卡酮(nootkatone)对慢性不可预知应激(CUS)模型小鼠抑郁样行为、海马脑区神经再生及蛋白激酶A(PKA)/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)/脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路的影响,以探讨诺卡酮的抗抑郁作用及其分子机制。方法 将雄性 C57BL/6 小鼠随机分为3组:对照组(0.9%氯化钠溶液),CUS组(CUS+0.9%氯化钠溶液),CUS+诺卡酮组(CUS+诺卡酮)。用糖水偏好和强迫游泳试验来评价小鼠的抑郁行为表型;用RT-PCR检测海马 BDNF 的 mRNA 表达,用 Western blot 法检测海马 BDNF、PKA 及磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(p-CREB)的表达;用免疫荧光检测海马齿状回脑区神经元的再生情况。结果 与对照组相比,CUS组小鼠糖水偏好降低($P < 0.05$),强迫游泳潜伏期减少和不动时间增加($P < 0.05$),海马 BDNF mRNA 和蛋白表达量、PKA 和 p-CREB 蛋白表达量降低($P < 0.05$);与 CUS 组小鼠相比,CUS+诺卡酮组小鼠糖水偏好增加($P < 0.05$),强迫游泳潜伏期增加和不动时间减少($P < 0.05$),BDNF mRNA 和蛋白表达量、PKA 和 p-CREB 的蛋白表达量增加($P < 0.05$)。与对照组比较,CUS组海马双皮质素(DCX)标记神经元数量降低($P < 0.05$);与 CUS 组比较,CUS+诺卡酮组 DCX 标记神经元数量增加($P < 0.05$)。结论 诺卡酮可改善 CUS 小鼠抑郁症状,其机制可能与海马齿状回神经再生和 PKA/CREB/BDNF 信号通路的激活有关。

关键词 抑郁症;慢性不可预知应激;诺卡酮;神经再生;脑源性神经营养因子

中图分类号 R 749

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0725-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.010

抑郁症是一种发病率较高且容易复发的精神疾

病,其特征是情绪低落、快感缺乏、思维迟缓等,严重者可有自杀倾向,近年来抑郁症的患病率呈逐年上升趋势^[1]。传统抗抑郁药物一般需要几周到几个月的治疗周期,并且近 50% 的抑郁症患者治疗反应差或没有反应^[2]。诺卡酮(nootkatone)是一种天然存在的倍半萜烯类,是有益智作用的中草药提取物^[3]。研究^[4]表明诺卡酮具有改善认知功能损伤的神经保护作用,但是其对慢性应激诱导抑郁表型的影响作用和机制尚不明确。海马神经再生受损与抑郁症的发生和发展密切相关,许多抗抑郁药物通过增加海马神经再生起到治疗抑郁症的作用^[5],脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)作为抑郁症的重要致病基因在脑内广泛分布,尤其是海马脑区^[6]。该研究用慢性不可预知应激(chronic unpredictable stress, CUS)建立小鼠抑郁模型,研究诺卡酮对小鼠抑郁表型的影响,同时检测海马脑区神经再生和蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)/环腺苷酸反应元件结合蛋白(cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, CREB)/BDNF 信号通路相关蛋白的表达,以探讨诺卡酮的抗抑郁作用及其机制,为新型抗抑郁药物的研发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 24 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠(20~25 g, 8 周龄),购自济南朋悦实验动物繁育有限公司[许可证号:SYXK(鲁)20190003]。每笼饲养 5 只,饲养温度(22 ± 2)℃、相对湿度(55 ± 5)%、12 h/12 h 光暗循环的环境,动物可以自由获取食物颗粒和水。实验过程中动物处置均符合滨州医学院附属医院动物伦理委员会标准。

1.2 试剂与仪器 诺卡酮(nootkatone)购于美国 Sigma 公司,批号:C5724;RNA 组织提取试剂盒购于广州 Omega 公司;RNA 反转录试剂盒购于大连 Takara 公司;RIPA 裂解液及 Tween-20 购自于上海碧云天生物技术有限公司;AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒购自于南京诺唯赞生物科技股份

2022-03-02 接收

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR201702220320);山东省医药卫生科技发展计划(编号:202003090720、202003070728)

作者单位:滨州医学院附属医院¹ 代谢与神经精神疾病研究所、² 神经内科、³ 精神科,滨州 256603

作者简介:王凯新,女,硕士,主治医师;

陈金波,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: chenjinbo6720@126.com

有限公司;鼠抗 β -actin、兔抗 CREB、兔抗磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, p-CREB)、兔抗 PKA 均购于美国 Cell Signaling Technology 公司;兔抗 BDNF、免疫荧光双皮质素(doublecortin, DCX)抗体购于英国 Abcam 公司;驴抗鼠二抗 IR Dye680LT、羊抗兔二抗 IR Dye800CW 购自美国 Li-COR 公司;ALexafluor 546 驴抗兔荧光二抗购于美国 Thermo Fisher 公司;小鼠自主活动试验数据用 Any-maze 软件分析,购自于美国 Stoelting 公司。双红外激光成像系统 Odyssey Sa 购自美国 Li-COR 公司;共聚焦显微镜(FV1200)购自日本东京奥林巴斯有限公司。

1.3 实验步骤及分组 将小鼠随机分为3组,即对照组、CUS 组、CUS + 诺卡酮组。CUS 组、CUS + 诺卡酮组小鼠连续给 14 d CUS,同时,每天在应激之前腹腔注射等剂量的 0.9% 氯化钠溶液或 10 mg/kg 诺卡酮,对照组仅每天腹腔注射等剂量的 0.9% 氯化钠溶液。CUS 是按照实验室先前研究报道的步骤进行^[7],应激包括束缚 1 h、摇晃和拥挤 1 h、夹尾 20 min、24 h 光照、8 °C 冷水中游泳 5 min、湿盒 4 h、电击 10 min,每天随机给予小鼠任意一种上述应激,以确保实验的不可预测性。第 15 天进行蔗糖偏好试验,第 16 天进行强迫游泳试验,第 17 天进行自主活动试验。第 18 天将部分小鼠断头处死,在冰盘上取脑,用 0.9% 氯化钠溶液冲洗干净后,将小鼠左右侧海马迅速剥离取出,并放入液氮速冻,储存在 -80 °C 中备用。部分小鼠进行灌注固定,取脑进行免疫荧光。

1.4 糖水偏好试验 在整个 CUS 过程中,给予对照及实验小鼠双瓶纯水适应,小鼠可以自由选择饮水,以免小鼠对饮水位置偏好导致结果偏差;实验前禁水 4 h,测试时小鼠单笼饲养,一侧给予一瓶纯水,另一侧放置一瓶 1% (w/v) 蔗糖溶液,使小鼠可以自由选择纯水或蔗糖溶液;在测试结束时,通过称重来计算摄入量。根据以下公式计算蔗糖偏好值:蔗糖摄入量/(蔗糖摄入量 + 水摄入量)。

1.5 强迫游泳试验 小鼠被放在装有新鲜自来水(温度:24 °C \pm 1 °C,高度:15 cm)的圆柱形玻璃容器(高 25 cm,直径 10 cm)中测试 6 min 游泳,前 2 min 内记录小鼠首次出现静止不动状态的时间即潜伏期,后 4 min 中记录小鼠不动状态的总持续时间。小鼠在水面漂浮或只有维持呼吸和漂浮的必要轻微运动被定义为不动状态。

1.6 自主活动试验 小鼠在单笼适应 4 h 后,轻轻放在测试装置(40 cm \times 40 cm \times 40 cm)的中心位置,小鼠可以自由活动。小鼠的运动通过安装在笼子上的红外光电传感器进行监控,记录小鼠 30 min 内的运动情况。

1.7 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 按照 Omega 公司的组织 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,用 RNA 反转录试剂盒生成 cDNA,然后用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行荧光定量 PCR,具体反应条件:95 °C、5 min,95 °C、10 s,60 °C、30 s,40 个循环;相关引物序列如下:BDNF, (Forward) 5'-CCCTGGCTGACACTTTTGAG-3', (Reverse) 5'-TCCAGCAGAAAGAGCAGAGG-3'; β -tubulin, (Forward) 5'-AGCAACATGAATGACCTGGTG-3', (Reverse) 5'-GCTTCCCTAACCTGCTTGG-3'。根据荧光曲线的循环阈值(cycle threshold, Ct),按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达量。

1.8 Western blot 用 RIPA 组织细胞裂解液从海马组织中提取总蛋白。用 BCA 法进行蛋白质定量,随后加入 5 \times 蛋白上样缓冲液,在 100 °C 条件下煮沸 8 min。各个样品用 8% ~ 15% 的分离凝胶进行 SDS-PAGE 电泳,并转到 PVDF 膜上,后用 TBST 溶液(20 μ mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 μ mol/L NaCl, 0.1% Tween-20)配制的 5% 脱脂奶粉封闭 90 min,之后加入一抗(1 : 1 000),4 °C 摇床孵育过夜。之后孵育二抗(1 : 5 000),室温摇床 90 min。经双红外激光成像系统成像并识别灰度进行分析。

1.9 免疫荧光实验

1.9.1 灌注小鼠 使用 4% 水合氯醛将小鼠深度麻醉,用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)经左心室灌注,肝脏变白后更换 4% 多聚甲醛灌注固定,断头取脑后,4% 多聚甲醛固定过夜,30% 蔗糖溶液脱水。用 OCT 冷冻切片包埋剂包埋脑组织,冰冻切片,切片厚度为 40 μ m。

1.9.2 免疫荧光染色 取含有海马区域的切片进行 DCX 免疫荧光染色。将含有 1% 牛血清白蛋白、3% Triton X-100、0.3% 驴血清的 PBS 液室温封闭 1 h;兔抗 DCX(1 : 1 000)一抗,4 °C 过夜;加 Alexa Fluor 546 驴抗兔(1 : 300),室温孵育 4 h;用抗荧光衰减封片剂封片。在共聚焦荧光显微镜下观察海马齿状回染色结果并拍照。

1.10 统计学处理 用 Graphpad Prism 7.0 软件进行实验数据统计、分析、做图。应用 Shapiro-Wilk 检验验证各组数据正态分布情况,各组数值以 $\bar{x} \pm s$ 表

示。3组实验数据之间进行单因素方差分析(One-way ANOVA),并利用Turkey进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 诺卡酮对CUS诱导的小鼠抑郁行为的影响

根据流程图(图1A)进行CUS刺激和诺卡酮注射,之后测定抑郁行为。单因素方差分析显示CUS刺激和诺卡酮给药对糖水偏好值有影响,差异有统计学意义($F = 20.88, P < 0.05$)。进一步比较分析结果显示,与对照组比较,CUS组糖水偏好百分比降低($P < 0.05$);与CUS组比较,CUS + 诺卡酮组糖水偏好百分比增加($P < 0.05$),见图1B。单因素方差分析显示CUS刺激和诺卡酮给药对强迫游泳潜伏期有影响,对强迫游泳的不动时间亦有影响,差异皆有统计学意义($F = 19.11, P < 0.05; F = 9.46, P <$

0.05)。进一步比较分析结果显示,与对照组相比,CUS组强迫游泳潜伏期降低($P < 0.05$)和不动时间增加($P < 0.05$);与CUS组比较,CUS + 诺卡酮组强迫游泳潜伏期增加($P < 0.05$)和不动时间降低($P < 0.05$),见图1C。为评估小鼠运动活动情况,对小鼠进行自主活动试验,比较分析结果显示各组之间小鼠每2 min的运动距离($P > 0.05$)及30 min内运动总距离差异均无统计学意义。见图1D。

2.2 诺卡酮对CUS模型小鼠海马BDNF的表达的影响

单因素方差分析显示,CUS刺激和诺卡酮给药对BDNF mRNA和蛋白表达有影响,差异有统计学意义($F = 9.98, P < 0.05; F = 6.58, P < 0.05$)。进一步比较分析结果显示,与对照组比较,CUS组海马中BDNF mRNA和蛋白表达水平降低($P < 0.05$);与CUS组比较,CUS + 诺卡酮组BDNF mRNA和蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。见图2。

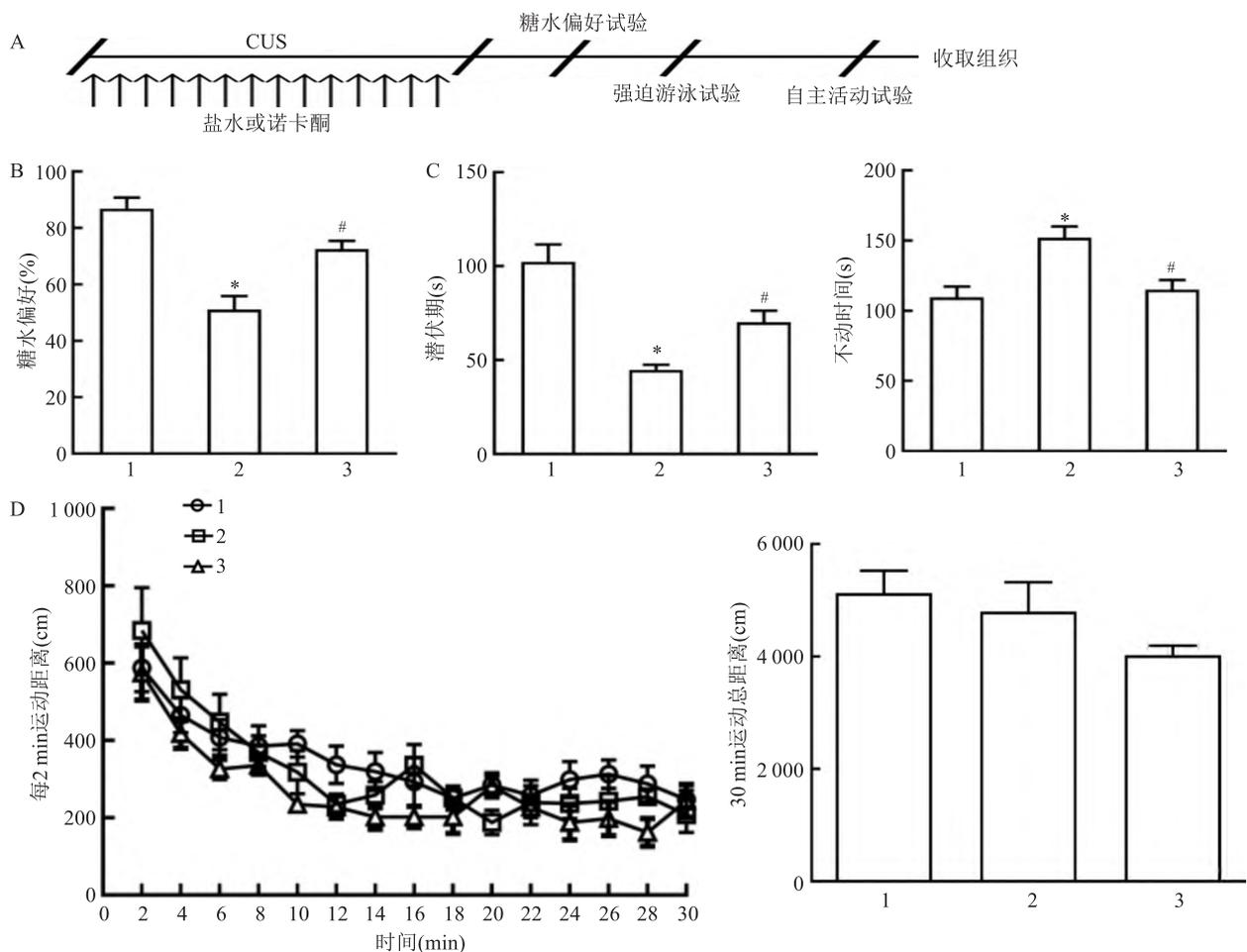


图1 诺卡酮对CUS诱导的小鼠抑郁行为的影响

A:实验设计图;B:糖水偏好试验;C:强迫游泳的潜伏期及不动时间测试;D:自主活动试验;1:对照组;2:CUS组;3:CUS + 诺卡酮组;与对照组比较: * $P < 0.05$;与CUS组比较: # $P < 0.05$

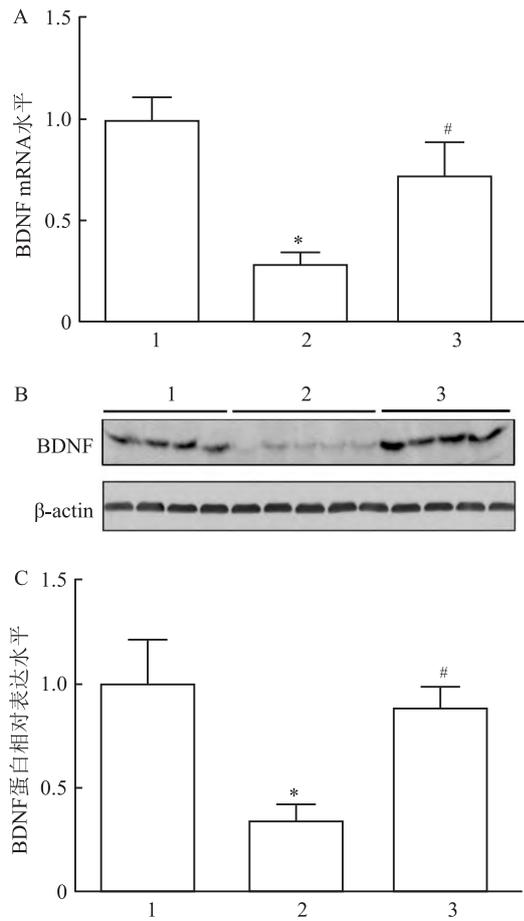


图2 诺卡酮对 CUS 诱导的小鼠海马脑区 BDNF 表达的影响 (n = 5)

A:BDNF mRNA 相对表达水平;B:BDNF 蛋白检测 Western blot 图;C:BDNF 蛋白水平统计图;1:对照组;2:CUS 组;3:CUS + 诺卡酮组;与对照组比较: * P < 0.05;与 CUS 组比较: # P < 0.05

2.3 诺卡酮对 CUS 模型小鼠海马 PKA/CREB 信号通路的影响 单因素方差分析显示,CUS 刺激和诺卡酮给药对 PKA 和 p-CREB 的表达水平有影响,差异有统计学意义 ($F = 14.90, P < 0.05; F = 11.46, P < 0.05$)。进一步比较分析结果显示,与对照组比较,CUS 组海马中 PKA 和 p-CREB 表达水平降低 ($P < 0.05$);与 CUS 组比较,CUS + 诺卡酮组海马中 PKA 和 p-CREB 的表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 诺卡酮对 CUS 模型小鼠海马齿状回神经元再生的影响 单因素方差分析显示,CUS 刺激和诺卡酮给药对 DCX 标记的神经元数量有影响,差异有统计学意义 ($F = 8.01, P < 0.05$)。进一步比较分析结果显示,与对照组比较,CUS 组海马 DCX 标记神经元数量降低 ($P < 0.05$);与 CUS 组比较,CUS + 诺卡酮组 DCX 标记神经元数量增加 ($P < 0.05$)。见

图 4。

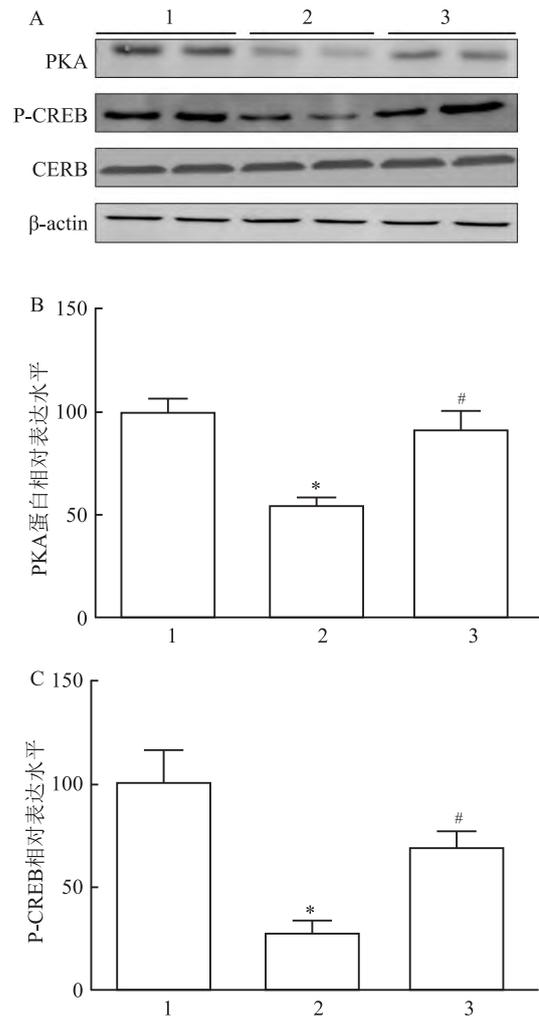


图3 诺卡酮对 CUS 诱导的小鼠海马脑区 PKA 和 p-CREB 表达的影响

A:PKA 和 p-CREB 蛋白检测 Western blot 图;B:PKA 蛋白定量分析;C:p-CREB 蛋白定量分析;1:对照组;2:CUS 组;3:CUS + 诺卡酮组;与对照组比较: * P < 0.05;与 CUS 组比较: # P < 0.05

3 讨论

研究表明,诺卡酮具有多种药理特性,如杀菌、抗氧化和抗过敏活性^[8];诺卡酮具有通过 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路抑制神经炎症而发挥神经保护和改善认知功能障碍的作用^[9]。最近研究^[10]报道诺卡酮具有通过激活 Keap1/Nrf2/HO-1 抗氧化途径而发挥抗肝损伤诱导的抑郁和焦虑的活性。因此,该研究在 CUS 所诱导的小鼠抑郁模型上验证了诺卡酮的抗抑郁活性。结果显示,诺卡酮具有明显的抗抑郁作用,与以前的报道一致^[11],表明诺卡酮对多种方式导致的抑郁症均有治疗作用。

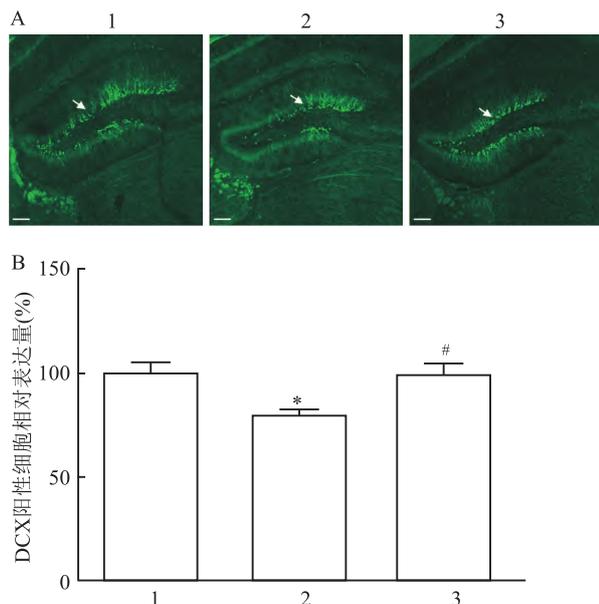


图4 诺卡酮对 CUS 诱导的小鼠海马脑区 DCX 标记神经元数量的影响

A: DCX 免疫荧光图 $\times 40$; B: DCX 阳性细胞定量结果; 箭头所示: 海马齿状回; 1: 对照组; 2: CUS 组; 3: CUS + 诺卡酮组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 CUS 组比较: # $P < 0.05$

BDNF 是脑内一种非常重要的神经营养因子, 具有广泛的神经保护和再生的作用^[12], 是抑郁症发病和治疗的重要标志蛋白^[13]。该研究结果显示, 诺卡酮可以明显改善 CUS 诱导的抑郁表型的同时, 也明显改善了 CUS 诱导的 BDNF 表达降低, 表明 BDNF 可能在诺卡酮的抗抑郁活性中发挥重要作用。研究^[14]表明抑郁症的发病和一些抗抑郁作用均涉及到 PKA/CREB 通路的调控, 并且 PKA/CREB 通路具有明显的调控 BDNF 表达的活性; 该研究进一步评价了诺卡酮对 PKA/CREB 通路的影响, 结果显示诺卡酮可以显著增加 CUS 导致的 PKA 和 p-CREB 表达的降低, 提示 PKA/CREB 通路可能参与了诺卡酮对 BDNF 表达的调控作用。

情绪的掌控主要由海马脑区负责, 同时研究^[15]证明哺乳动物的海马脑区中存在一个最独特的现象, 即整个生命过程中都可以有神经再生。而神经再生在抑郁症的发病机制中起着重要作用, 是应对压力应激的关键修复反应。DCX 仅出现于神经元形成的前 3 周, 是未成熟神经元的可靠标记。研究^[15]表明 DCX 阳性神经元主要存在于海马齿状回脑区中, CA1、CA3 中没有 DCX 信号, 即神经再生主要发生在海马齿状回脑区, 而在 CA1、CA3 中较少, 因此主要通过检测海马齿状回的 DCX 阳性神经元来判断神经再生的情况。该研究表明 CUS 可导致

海马齿状回神经再生障碍, 而诺卡酮可以改善海马齿状回的神经再生, 说明诺卡酮可能通过改善神经再生而发挥抗抑郁作用。

综上所述, 该研究表明诺卡酮可能通过增加海马齿状回神经再生及激活 PKA/CREB 通路增加 BDNF 的表达而发挥抗抑郁活性。诺卡酮可作为抗抑郁药物研究的新的候选化合物, 该研究为新的抗抑郁药物开发奠定了基础。

参考文献

- [1] Thornicroft G, Chatterji S, Evans-Lacko S, et al. Undertreatment of people with major depressive disorder in 21 countries [J]. *Br J Psychiatry*, 2017, 210 (2): 119-24.
- [2] 高贵元, 黄捷, 刘丹. 抑郁症的发病机制及抗抑郁药物的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2021, 18 (1): 52-5.
- [3] Leonhardt R H, Berger R G. Nootkatone [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2015, 148: 391-404.
- [4] He B, Xu F, Xiao F, et al. Neuroprotective effects of nootkatone from *alpiniae oxyphyllae fructus* against amyloid-beta-induced cognitive impairment [J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33 (1): 251-9.
- [5] Santarelli L, Saxe M, Gross C, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants [J]. *Science*, 2003, 301 (5634): 805-9.
- [6] Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (20): 7777.
- [7] Meng F, Liu J, Dai J, et al. Brain-derived neurotrophic factor in 5-HT neurons regulates susceptibility to depression-related behaviors induced by subchronic unpredictable stress [J]. *J Psychiatr Res*, 2020, 126: 55-66.
- [8] Nemmar A, Al-Salam S, Beegam S, et al. Thrombosis and systemic and cardiac oxidative stress and DNA damage induced by pulmonary exposure to diesel exhaust particles and the effect of nootkatone thereon [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 314 (5): H917-27.
- [9] Wang Y, Wang M, Xu M, et al. Nootkatone, a neuroprotective agent from *alpiniae oxyphyllae fructus*, improves cognitive impairment in lipopolysaccharide-induced mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 62: 77-85.
- [10] Yan T, Li F, Xiong W, et al. Nootkatone improves anxiety- and depression-like behavior by targeting hyperammonemia-induced oxidative stress in D-galactosamine model of liver injury [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36 (4): 694-706.
- [11] Harro J. Animal models of depression: pros and cons [J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 377 (1): 5-20.
- [12] Duman R S, Deyama S, Fogaca M V. Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53 (1): 126-39.

- [13] 孟凡涛,刘晶,王文涛. 慢性不可预测应激所致抑郁小鼠中缝背核脑区 BDNF 表达的变化[J]. 安徽医科大学学报,2019,54(12):1918-22.
- [14] Wu L, Zhang T, Chen K, et al. Rapid antidepressant-like effect of Fructus Aurantii depends on cAMP-response element binding protein/Brain-derived neurotrophic factor by mediating synaptic transmission[J]. *Phytother Res*,2021,35(1):404-14.
- [15] Moreno-Jimenez E P, Flor-Garcia M, Terreros-Roncal J, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease[J]. *Nat Med*,2019,25(4):554-60.

Effects of nootkatone on depression-like behavior and PKA/CREB/BDNF signaling pathway in hippocampus

Wang Kaixin^{1,2}, Wang Sanwang³, Zhai Qingling², Zhao Di¹,

Liu Jing¹, Meng Fantao¹, Li Chen¹, Chen Jinbo²

(¹*Institute for Metabolic & Neuropsychiatric Disorders*,²*Dept of Neurology*,

³*Dept of Psychology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603*)

Abstract Objective To observe the effects of nootkatone on depression-like behavior, neurogenesis and protein kinase A(PKA)/cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein(CREB)/brain-derived neurotrophic factor(BDNF) signaling pathway in hippocampus of chronic unpredictable stress(CUS) treated mice, and to explore the role and molecular mechanism of nootkatone's antidepressant effect. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups: the control group(saline), the CUS group(CUS+saline), the CUS+nootkatone group(CUS+nootkatone). The sucrose preference test and forced swim test were used to evaluate the depression-like behaviors. The mRNA expression of BDNF in hippocampus was measured by RTPCR. The expression levels of BDNF, PKA and phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein(p-CREB) in hippocampus were determined by Western blot. The level of neurogenesis was measured by immunofluorescence. **Results** Compared with the control group, the sucrose preference decreased ($P < 0.05$) and the latency decreased ($P < 0.05$), and immobility time increased in forced swim test ($P < 0.05$) in CUS group, the expression levels of BDNF mRNA ($P < 0.05$) and protein ($P < 0.05$), PKA ($P < 0.05$) and p-CREB ($P < 0.05$) decreased. The sucrose preference of the CUS+nootkatone group increased ($P < 0.05$) and the latency increased ($P < 0.05$), and immobility time decreased in forced swim test ($P < 0.05$), the expression levels of BDNF mRNA ($P < 0.05$) and protein ($P < 0.05$), PKA ($P < 0.05$) and p-CREB ($P < 0.05$) increased in comparison with the CUS group. Compared with control group, the number of hippocampal doublecortin(DCX) labeled neurons decreased($P < 0.05$) in CUS group. Compared with the CUS group, the number of DCX labeled neurons increased in the CUS+nootkatone group ($P < 0.05$). **Conclusion** The improvement of depressive symptoms in CUS mice by nootkatone may be related to the neurogenesis in dentate gyrus of hippocampus and the activation of PKA/CREB/BDNF signaling pathway.

Key words depression; chronic unpredictable stress; nootkatone; neurogenesis; brain-derived neurotrophic factor